

1969

THESIS

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG
ÜBER INITIALE METABOLITSPEKTREN
VON TESTOSTERON IN LEBER UND NIERE
UNREIFER MÄNNLICHER RATTEN**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
WERNER CORDIER

aus
BRÜHL

BONN 1969

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG
ÜBER INITIALE METABOLITSPEKTREN
VON TESTOSTERON IN LEBER UND NIERE
UNREIFER MÄNNLICHER RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

WERNER CORDIER

aus

BRÜHL

BONN 1969

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn.

Referent: Prof. Dr. K.-O. Mosebach

Korreferent: Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl

Tag der mündlichen Prüfung: 6.3.1969

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität

B o n n

Meiner Frau gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsübersicht

	<u>Seite</u>
Einleitung	7
Theoretischer Teil	9
Experimenteller Teil	15
A Methode	15
1. Radiochemikalien und Referenzsubstanzen	15
2. Tiere und Injektionen	15
3. Aufarbeitung der Organe	15
a) Homogenisierung	15
b) Extraktion der gesamten Metabolite	16
4. Trennung und Identifizierung der Metabolite	16
a) Trennung in freie und konjugierte Metabolite	16
b) Verseifung der Konjugate	17
c) Papierchromatographische Trennungen	17
α) Papierchromatographische Systeme	17
β) Praktische Durchführung der Chromatographie	20
d) Nachweis der Referenzsubstanzen	22
α) Δ^4 -3-oxo-Steroide	22
β) Gesättigte Oxo-Steroide	23
γ) Dihydroxy-C ₁₉ -Steroide	23
e) Mikrochemische Reaktionen	23
α) Oxydation mit CrO ₃	23
β) Girard-Trennung	24
f) Radioaktivitätsbestimmungen	25

	Seite
5. Anfertigung von Massenspektren der verwendeten Referenzsubstanzen	26
a) Gerät und Einsatz	26
b) Beispiele für Referenzsubstanzen	32
B Ergebnisse	37
1. Mengenverhältnisse von freien zu konjugierten Metaboliten in Leber und Niere	37
2. Freie Metabolite	38
a) Mengenverhältnisse hoch- und niederpolarer Metabolite	38
b) Einzelmetabolite in der Leber	40
c) Einzelmetabolite in der Niere	46
3. Aus Konjugaten freigesetzte Metabolite	49
Zusammenfassung	56
Literaturverzeichnis	58

Einleitung

Der Wirkungsmechanismus eines Hormons ist noch in keinem Falle befriedigend aufgeklärt worden (1). Das gilt insbesondere für die initialen Phasen. Eines der Probleme ist das der Organspezifität. Warum sind einige Organe, sog. Erfolgsorgane, von den Wirkungen des interessierenden Hormons betroffen und andere nicht? Es bieten sich vor allem zwei Antworten an. Die eine beinhaltet die Annahme organspezifischer Rezeptoren, die andere die Annahme organspezifischer Metabolisierung.

In der physikalisch-chemischen Abteilung unseres Instituts wird seit einigen Jahren das initiale Schicksal von Testosteron unter möglichst physiologischen Bedingungen im Säugetierorganismus studiert (2). Hierbei stellte es sich im Rahmen von Übersichtsstudien heraus, daß sich die Metabolitspektren von Organ zu Organ zum Teil erheblich unterscheiden, wie im übrigen auch bei Vergleich von in-vivo- und in-vitro-Untersuchungen. Da sich Leber und Niere wegen ihrer relativen Größe für das in-vivo-Studium der Organmetabolite von Ratten besonders eignen, wurde die Aufgabe gestellt, die primären Metabolite dieser Organe einmal gründlich, bei jeweils denselben Tieren und im gemeinsamen Arbeitsgang, miteinander zu vergleichen. Da die Niere zum Unterschied von der Leber noch als Erfolgsorgan für Testosteron angesehen werden darf (3), bestand die Hoffnung, zur Klärung der Frage nach spezifischen Metabolitspektren in Erfolgsorganen beizutragen. Bei diesen Metabolitstudien galt es besonders sorgfältig darauf zu achten, ob in der Leber, wiederum im Vergleich mit der Niere Δ^4 -3-oxo-Metabolite, insbesondere Androst-4-en-3,

17-dion auftreten. Bei den bisherigen in-vivo-Studien des hiesigen Arbeitskreises war in der Leber kein Androstendion beobachtet worden, obwohl dieser Metabolit für in-vitro-Versuche mit Leber charakteristisch ist (4).

Wegen der erwähnten Größe der Leber im Verhältnis zu anderen Organen sollte gleichzeitig der Versuch gemacht werden, die Aufklärung der Metabolite durch Einsatz der Massenspektrometrie zu vervollkommen. Hierzu war vor allem die Anfertigung von Massenspektren aller infrage kommenden Testosteronmetabolite erforderlich.

Theoretischer Teil

Der Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen im Säugetierorganismus ist bis heute ungeklärt. In-vivo- und in-vitro-Versuche wurden eingesetzt, um Einblicke zu bekommen. Die Anzahl der unter in-vitro-Bedingungen vorgenommenen Untersuchungen überwiegt bei weitem. In-vivo- und in-vitro-Versuche führen nicht immer zu übereinstimmenden Ergebnissen. Das ist verständlich, weil es unmöglich ist, die für den lebenden Körper geltenden Bedingungen in vitro auch nur annähernd nachzuahmen.

Am hiesigen Institut werden seit Jahren in-vivo-Versuche mit Testosteron durchgeführt (5), um dessen ungestörte physiologisch-chemischen Reaktionen besser kennen zu lernen und mit den zahlreichen Erkenntnissen aus in-vitro-Versuchen vergleichen zu können.

Die in-vivo-Versuche wurden durchweg an 50 Tage alten männlichen Sprague-Dawley-Ratten vorgenommen. Diese erhielten physiologische Dosen von radioaktiv markiertem Testosteron (4-¹⁴C-Testosteron).

Bei in vivo-Versuchen unter physiologischen Bedingungen bestehen vor allem zwei Probleme. Das erste betrifft die Frage, ob die in den aufgearbeiteten Organen gefundenen Metabolite tatsächlich am Orte ihres Vorkommens entstanden sind und das zweite die Frage der physiologischen Dosis. Die erste Frage ist bei in-vivo-Versuchen wesentlich schwerer zu beantworten als bei in-vitro-Untersuchungen, bei denen die gefundenen Metabolite mit Sicherheit im jeweiligen Präparat entstanden sind. Aller-

dings steigt mit Verkürzung der Zeit zwischen Applikation und Tötung die Wahrscheinlichkeit, im vorliegenden Organ entstandene Metabolite vor sich zu haben.

Zur Frage der Dosishöhe lassen sich zwei Überlegungen anstellen. Einmal betrachtet man die Menge Hormon, die appliziert werden muß, um bei noch fehlendem oder ganz ausgefallenem Hormon (Substitutionstherapie) volle morphologische und funktionelle Reife der entsprechenden Erfolgsorgane zu erzielen bzw. wiederherzustellen. Die dabei gefundenen Werte sind natürlich abhängig von den jeweiligen Versuchsbedingungen. So werden beim Butenandt-Test (6) am Beispiel der Ratte vom 29. Lebenstage an 8 Tage lang den Tieren täglich einmal 100 μg Testosteron in 0,2 ml Sesamöl injiziert, wodurch die volle Reife der Vesikulardrüsen erzielt wird. Ausschlaggebend ist dabei, daß kleinere Dosen die Reifung weniger stark beschleunigen und größere keine weitere Steigerung zur Folge haben. Der auf diese Weise bei jungen männlichen Ratten gefundene Wert von 100 μg kann daher als physiologische Dosis betrachtet werden. Neben derartigen Testmethoden gewinnt man weitere Anhaltspunkte über die Höhe physiologischer Dosen durch Kenntnis der natürlichen Testosteronkonzentrationen im Blutplasma und in den Organen. Dieser Weg läßt sich zur Zeit noch nicht beschreiten, weil über die Testosteronkonzentrationen im Säugetierorganismus praktisch nichts bekannt ist.

Während mit Hilfe derartiger Versuche das Problem der Höhe der physiologischen Dosis in vivo relativ scharf umgrenzt und mit guten Annäherungswerten gelöst werden kann, treten im Falle der

in-vitro-Versuche bei der Frage nach der Dosishöhe erhebliche theoretische Schwierigkeiten auf. Meist werden Substratmengen eingesetzt, die auf in-vivo-Versuche umgerechnet, nicht nur toxisch, sondern sogar tödlich auf den Organismus wirken. Es ist noch nicht zu übersehen, inwieweit allein schon durch die Verwendung dieser hohen Dosen ein völlig anderes Metabolit-spektrum erzielt wird. So konnte bis heute bei allen in-vivo-Versuchen in der Leber praktisch kein Androstendion festgestellt werden, während es bei in-vitro-Versuchen regelmäßig vorkommt. Charakteristisch ist auch das Auftreten von gesättigten Dihydroxy-C₁₉-Steroiden bei den in-vitro-Versuchen, die anscheinend bei in-vivo-Versuchen nur eine unwesentliche Rolle spielen. Wahrscheinlich wird bei in-vitro-Versuchen auch die Bildung von Glukuroniden in den Organen erheblich überschätzt. Früh einsetzende Degenerationen des Gewebes mit Änderungen des Enzymmusters dürften ein weiterer Grund für die Unterschiede zwischen in-vitro- und in-vivo-Versuchen sein.

Ein spezielles Ziel dieser Arbeit ist daher die Klärung der Frage, ob Androstendion, das ein charakteristischer Metabolit in Leber und Niere bei in-vitro-Versuchen ist, auch bei in-vivo-Versuchen unter physiologischen Bedingungen in diesen Organen gefunden wird. Bei einer früheren Arbeit unter in-vivo-Bedingungen in der hiesigen Abteilung war kein Androstendion als Testosteronmetabolit in der Leber gefunden worden (7). Es erschien notwendig, diesen Befund in einer besonderen Arbeit zu erhärten.

Das erste männliche Sexualorgan wurde 1951 von Butenandt iso-

liert. Er gewann Androsteron aus Männerharn. Wenig später gelang Laqueur die Isolierung von Testosteron aus Stierhoden. Die chemische Wirkungsweise dieser Hormone ist bis heute noch unbekannt. Zur Lösung dieser Probleme ist es unter anderem notwendig, ein klares Bild über Verteilung und Metabolismus des Testosterons nach Eintritt in den Säugetierorganismus zu erhalten. Um den Weg des Testosterons verfolgen zu können, wurde es in radioaktiver Form (Testosteron-4- ^{14}C) appliziert. Erste Einblicke in das Schicksal von radioaktivem Testosteron gewannen Gallagher et al. (8) 1951, Barry et al. (9) 1952 und Ashmore et al. (10) 1953 bei Mäusen und Ratten. Spezielle Anreicherungen in bestimmten Organen konnten nicht festgestellt werden. Die Ergebnisse waren wenig aufschlußreich, weil einerseits zu wenig Organe berücksichtigt wurden, andererseits nicht auf Kohlenstoffmenge sondern auf Organgewicht bezogen wurde. Diesem Mangel wurde erstmalig durch die Arbeiten von Mosebach et al. (11) abgeholfen, bei denen die spez. Radioaktivität, ausgedrückt in Nanocurie pro mg Kohlenstoff, Meßgrundlage darstellte. Außerdem wurden sehr viele Organe untersucht. Die Tötungs- und Entnahmezeiten lagen zwischen 20 und 120 min post injectionem.

Nach diesen orientierenden Anfangsversuchen ging man daran, die Probleme systematisch zu bearbeiten. Die Tötungs- und Entnahmezeiten wurden schrittweise bis hinunter zu 3 Minutenwerten verkürzt. Dabei zeigte es sich, daß die Metabolitspektren der einzelnen Organe um so spezifischer sind, je kürzer die Versuchszeiten gewählt wurden. Einer Reihe von Organen können spezi-

fische Spektren zugeordnet werden. Die Untersuchungen erstreckten sich auf immer neue Organe, da bis heute noch keineswegs feststeht, welche Organe als primäre Erfolgsorgane des Testosterons anzusehen sind. Makroskopischen Verteilungs- und Metabolitstudien folgten Untersuchungen über die Lokalisation in den Zellorganellen bis hin zu den Bindungen an Eiweiße und einzelne Aminosäuren.

Das verwendete Tiermaterial wurde weitgehend standardisiert, nachdem vorher in unregelmäßiger Folge mit Ratten oder Mäusen verschiedener Stämme und verschiedenen Alters experimentiert worden war. Jetzt werden nur noch männliche 30 Tage alte Sprague-Dawley-Ratten verwendet, um frühere oder zukünftige Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können.

Hand in Hand mit der subtileren Aufarbeitung der Organe ging die Hinzuziehung feinerer und empfindlicherer Meßmethoden. Eingesetzt wurden in zeitlicher Reihenfolge der fensterlose Durchflußzähler, die Naßverbrennung mit anschließender Gasphasenmessung nach van Slyke (12) im Gaszählrohr nach Bernstein und Ballentine (13), die Radiopapierchromatographie, das Flüssigszintillationsspektrometer und die Histoautoradiographie.

Die Identifizierung der Metabolite erfolgte vorwiegend durch die Papierchromatographie mit Hilfe von Referenzsubstanzen. Es wurde untersucht, ob die radioaktiven Metabolite sich bei verschiedenen chromatographischen Systemen, bei einer Reihe von Mikroreaktionen und bei der Isotopenverdünnungstechnik wie die Standards verhielten. Die Isolierung der Produkte in kristalliner Form und in wägbarer Menge war wegen des Grundsatzes, mit

physiologischen Dosen zu arbeiten, nicht möglich. Hierzu wäre die Aufarbeitung von ca. 10.000 Ratten erforderlich. Es besteht daher ein Interesse, für die in-vivo-Studien des Stoffwechsels von Steroidhormonen unter physiologischen Bedingungen noch differenziertere Methoden der Identifizierung zu erproben. Neben der Gaschromatographie bietet sich hier die Massenspektrometrie an.

Der zweite Teil dieser Arbeit bestand daher darin, mit Hilfe erster tastender Versuche die Eignung der Massenspektrometrie für das Studium des in-vivo-Schicksals von Testosteron zu prüfen. Dabei war es zunächst notwendig, für die am häufigsten vorkommenden Metabolite Spektren zu erstellen, an Hand derer unbekannte Substanzen erkannt werden können. Darüberhinaus sollten erste Versuche zeigen, ob es möglich ist, in Mengenbereiche von 10^{-1} bis 10^{-2} μg vorzudringen.

Experimenteller Teil

A Methode

1. Radiochemikalien und Referenzsubstanzen.

Eingesetzt wurden 100 μC Testosteron-4- ^{14}C mit einer spez. Aktivität von 30 mc/mMol, das in einer Benzollösung von "The Radiochemical Centre" in Amersham (England) geliefert wurde. An inaktiven Referenzsubstanzen wurden Androst-4-en-17 β -ol-3-on, Androst-4-en-3,17-dion, 5 α -Androstan-3 α -ol-17-on, 5 β -Androstan-3 α -ol-17-on, 5 β -Androstan-3 α -ol-17-on, 5 α -Androstan-3,17-dion und 5 β -Androstan-3,17-dion verwendet.

2. Tiere und Injektionen.

Es wurden 30 Tage alte männliche Sprague-Dawley-Ratten eingesetzt. Für je 5 Tiere standen 100 μC Testosteron-4- ^{14}C zur Verfügung. Das in Benzol gelöste Testosteron wurde eingetrocknet und in 2 ml eines Gemisches Propylenglykol/Wasser 1:1 aufgenommen. Da beim Aufziehen in die Spritze Verluste unvermeidbar sind, wurden jedem Tier nur 0,38 ml, insgesamt also 1,90 ml, injiziert. Somit erhielt jedes Tier nur etwa 18 μC anstelle der theoretisch möglichen Menge von 20 μC . 1,2-Propylenglykol wurde gewählt, weil es wasserähnlich, nicht toxisch und gut resorbierbar ist.

3. Aufarbeitung der Organe.

a) Homogenisierung.

40 Minuten nach Beendigung der Injektion wurden die Tiere dekapiert und Leber und Niere entnommen. Diese Zeitspanne wurde gewählt, weil vorangegangene Untersuchungen gezeigt hatten, daß nach dieser Zeit die Verteilung des injizierten Testosterons besonders differenziert ist und beispielsweise Leber sowie die

Organe des Urogenitaltraktes maximale Radioaktivitätsmengen aufweisen. Nach kurzer Stüßerung in aqua destillata wurden die in einem Dewar-Gefäß eingefrorenen Organe mit ca. 50 ml Methanol unter Eiskühlung homogenisiert.

b) Extraktion der gesamten Metabolite.

Das Homogenat wurde zentrifugiert und der Überstand in einen Rundkolben überführt. Der entstandene Rückstand wurde zur möglichst erschöpfenden Extraktion zunächst in 50 ml Äthylazetat aufgenommen, eine Stunde geschüttelt, abzentrifugiert und der Überstand zum Vorigen gegeben. Der Rückstand wurde erneut in 50 ml eines Chloroform-Äthergemisches 1:4 aufgenommen, wiederum eine Stunde geschüttelt, abzentrifugiert und der Überstand ebenfalls in den Sammelkolben gegeben. Zum Schluß wurde der Rückstand in 50 ml Azeton suspendiert und eine halbe Stunde lang bis zum schwachen Sieden erwärmt, dann langsam abgekühlt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in den Sammelkolben gegeben. Die gesammelten organischen Extrakte wurden im Rotationsverdampfer eingedampft. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität wurde der Rückstand in einer definierten Lösungsmittelmenge (5 ml) gelöst und hiervon in der Regel 50 μ l für die Radioaktivitätsmessung eingesetzt.

4. Trennung und Identifizierung der Metabolite.

a) Trennung in freie und konjugierte Metabolite.

Der zur Bestimmung der Gesamtaktivität in 5 ml Methanol-Chloroform aufgenommene Extrakt wurde erneut eingedampft, der Rückstand in 40 ml Methylenchlorid aufgenommen und unter Schütteln erwärmt. Nach Zugabe von 20 ml H_2O wurde 5 Minuten erneut kräftig

geschüttelt. Dabei reicherten sich die wasserlöslichen konjugierten Metabolite in der wässrigen Phase, die fettlöslichen freien Metabolite dagegen in der Methylenchloridphase an. Die untere Methylenchloridphase wurde abpipetiert. Zur erschöpfenden Extraktion wurden anschließend die wässrigen Phasen noch zweimal mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und die einzelnen Methylenchloridfraktionen in einem Kolben gesammelt. Es folgte die Messung der Gesamtaktivität der freien Steroide.

b) Verseifung der Konjugate.

Die wässrige Phase wurde mit 10 % Schwefelsäure auf pH-Wert 1 eingestellt, mit 40 ml Äthylazetat versetzt und 5 Minuten geschüttelt. Die Äthylazetatphase wurde abpipetiert und der Vorgang noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Äthylazetatextrakte wurden mit 10 ml H_2O ausgeschüttelt, bis die wässrige Phase schwach sauer oder besser neutral war. Der Äthylazetatextrakt wurde eingedampft, der Rückstand mit 50 ml 5 % H_2SO_4 versetzt und am Rückflußkühler eine Stunde lang auf $60^\circ C$ erhitzt. Es tritt Verseifung ein. Mit 40 % NaOH wurde neutralisiert. Das neutralisierte Hydrolysat wurde mit Methylenchlorid dreimal extrahiert und der Extrakt anschließend eingedampft. Die Aktivitäten der freigesetzten Steroide wurden ebenfalls mit dem Flüssigszintillationsspektrometer bestimmt.

c) Papierchromatographische Trennungen.

α) Papierchromatographische Systeme.

Für die Papierchromatographie mit Bush-Systemen wurden Whatman II Papiere verwendet, die in 18 cm breite Streifen geschnitten und vor der Benutzung 2 Tage lang in einer Spezialapparatur mit

Benzol/Methanol/Äthylazetat 10:10:1 gereinigt wurden. Substrat und Standards wurden in den einzelnen Bahnen auf gleicher Höhe, dem sog. Start, mit Lambdapipetten aufgetragen. Die Ausbreitung der einzeln aufgetragenen Tropfen wurde durch gleichzeitiges Trocknen mit einem feinen Stickstoffstrahl möglichst klein gehalten. Auf diese Weise gelang es, die Substanzen auf einen relativ kleinen Fleck zu konzentrieren. Stickstoff wurde zur Trocknung genommen, weil er sehr reaktionsträge ist. Um eine Berührung der Auftragsstelle mit der Unterlage zu vermeiden, wurde der Papierbereich der Startlinie zwischen Glasplatten eingespannt.

Das eingedampfte und mit 0,3 ml Methanol/Chloroform 1:1 wieder aufgenommene Versuchsgut wurde auf den 3 cm breiten Mittelstreifen aufgetragen. Von den Referenzsubstanzen wurden je 3 mg in 1 ml Methanol gelöst und je 10 μ l (30 μ g) hiervon auf den Startpunkt der seitlich angrenzenden Bahnen aufpipetiert. Zum Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeiten in Haupt- und Nebenbahnen wurden bei jedem Chromatogramm die ungesättigten, UV-positiven Steroidstandards Testosteron und Androstendion nicht nur auf den Seitenbahnen eingesetzt, sondern gleichzeitig dem Versuchsgut beige mischt und mit diesem gemeinsam aufgetragen. Auf diese Weise konnten bei etwaigen Differenzen der R_F -Werte von Testosteron bzw. Androstendion die R_F -Werte der übrigen Standards korrigiert werden.

Ein Gemisch von Heptan/Benzol/Methanol/Wasser im Verhältnis 67:55:80:20 (14) wurde mehrere Stunden mechanisch geschüttelt. Trennung der beiden Phasen erfolgte anschließend in einem

Scheidetrichter. Die obere Phase diente als Laufmittel, die untere zur Erzeugung der Atmosphäre im Tank. Als Laufmittel wurden jeweils 350 ml eingesetzt.

Mit diesem System ließ sich eine recht gute Gruppentrennung durchführen. C_{19} -Metabolite mit 3 Sauerstofffunktionen liegen in Startnähe, Testosteron und die gesättigten Dihydro- C_{19} -Steroide etwa in der Mitte des Chromatogramms; die gesättigten Monohydroxy-monoxo- sowie die Dioxo- C_{19} -Metabolite im letzten Drittel des Chromatogramms.

Zur Trennung der hochpolaren Metabolite, insbesondere der Dihydroxy-monoxo- und Monohydroxy-dioxo-Metabolite, eignet sich vor allem das System Cyclohexan/Toluol/Methanol/Wasser 50:50:70:30 (15), vorallem bei dreistufigem Lauf (Zwischen jedem Lauf Trocknung des Chromatogramms). Eine Gruppentrennung der hochpolaren Metabolite (hydroxylierte Produkte) gelingt auch mit Benzol/Äthylazetat/Methanol/Wasser 7:3:5:5 (16).

Schwierigkeiten bereitet auch die Trennung von Monohydroxy-monoxo- C_{19} -Steroiden, die als in-vivo-Metabolite des Testosterons regelmäßig auftreten, nämlich die Trennung von Androsteron, Ätiocholanolon und Androstendion. Hier eignet sich das Zaffaroni-System Methylcyclohexan/Butan-1,3-diol (absteigend 11 Stunden) (17). Hierbei bewährt sich die Verwendung von Whatman I - Papier anstelle von Whatman II - Papier. Die Chromatographiestreifen werden durch ein Gemisch Butandiol/Methanol 1:3 gezogen. Der Überschuß an Flüssigkeit wurde durch Filterpapier abgenommen. Dann werden die Streifen 10 Minuten an der Luft vorge-trocknet. Die Beimengung von Methanol hat lediglich den Zweck,

die Durchtränkung des Papiers mit Butandiol zu erleichtern. Es muß vor dem Auftragen des Gemisches völlig verdunstet sein. Das Laufmittel wurde durch Schütteln von 4 Teilen Methylcyclohexan und 1 Teil Butandiol gewonnen. Die untere Phase wurde verworfen, die obere eingesetzt. Zur Herstellung der Atmosphäre diente hier ausschließlich das Laufmittel selbst. Während des Auftragens wurde das Chromatographiepapier in einen Filterpapierbogen eingeschlagen, um die Imprägnierung zu schonen.

B) Fraktische Durchführung der Chromatographie.

Runde Glasbehälter von 60 cm Höhe und 25 cm innerem Durchmesser wurden als Tanks verwendet. Sie wurden durch einen geschliffenen Glasdeckel verschlossen. Als hervorragendes Dichtungsmittel, das gegen organische Dämpfe beständig ist, erwies sich ein Gemisch von Glycerin und Stärke (bis zur klaren Lösung erwärmt). Der Deckel besaß eine mit einem Glasstopfen verschließbare Öffnung, durch die das Laufmittel mit Hilfe eines Trichters in die Chromatographieschale eingefüllt werden konnte. Guter Verschluß und Möglichkeit zum schnellen Einfüllen des Laufmittels gewährleisteten Erhaltung einer konstanten Atmosphäre, die zur Herstellung reproduzierbarer R_F -Werte wesentlich sind. Um eine möglichst große verdunstende Oberfläche zu erhalten, wurde die Wand des Tanks, bis auf ein Fenster zur Beobachtung der Lösungsmittelfront, mit Filterpapier ausgekleidet. Außerdem wurde ein Becherglas mit eingerolltem Filterpapierbogen auf den Boden gestellt. Der Tankboden wurde etwa 3 cm hoch mit der im Scheidetrichter erhaltenen unteren Phase gefüllt; in das Becherglas wurden ca. 100 ml obere Phase gebracht. Beide Flüssigkeiten

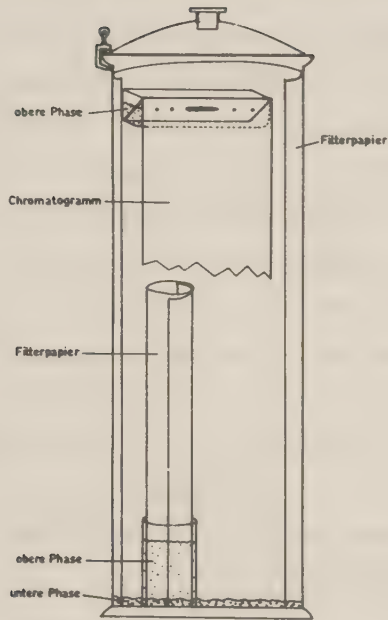


Abb. 1 Ansicht eines der zur Papierchromatographie verwendeten Tanks.

stiegen kapillar im Filterpapier auf, wodurch die verdunstende Oberfläche erheblich vergrößert wurde. Die Tanks befanden sich in einem Raum mit konstanter Temperatur. Die Chromatographieschale mit eingelegter Glasplatte und Glasstäbchen zum Halten des Chromatogramms wurde von einem Ständer etwa 25 cm über dem Tankboden gehalten, sodaß der Streifen für die absteigende Chromatographie frei herabhing. Das Chromatogramm wurde 12 Std. vor Einfüllen des Laufmittels eingehangen und der Tank verschlossen.

Sollten alle im Gemisch enthaltenen Metabolite erfaßt werden, wurde das Chromatogramm aus dem Tank entfernt, sobald die Laufmittelfront 1 cm vor Streifenende angelangt war. Die dazu benötigte Zeit wurde als eine Laufzeit definiert. Die Laufzeiten bei den nicht imprägnierten Systemen sind relativ kurz. Sie betragen ca. 3-4 Stunden. War eine Auftrennung der besonders langsam wandernden polaren Metabolite erwünscht, so wurde mit der zwei- oder dreifachen Laufzeit entwickelt, wobei man in Kauf nehmen mußte, daß die schnell wandernden Metabolite mit dem Laufmittel in den Tank abtropften. Um diese Metabolite verwerten zu können und eine Verseuchung des Tanks zu vermeiden, wurde das abtropfende Laufmittel in Bechergläsern aufgefangen. Nach beendeter Entwicklung wurde das Chromatogramm an der Luft und unter dem Abzug getrocknet und in einem sauberen Bogen Filterpapier aufbewahrt.

d) Nachweis der Referenzsubstanzen.

α) Δ^4 -3-oxo-Steroide.

Der Farbnachweis von Testosteron und Androstendion sowie die zugehörigen hydroxylierten Produkte erfolgte mit Isonicotinsäurehydrazid (18). Dazu wurden 200 mg dieser Substanz in 0,1 ml konz. Salzsäure und 25 ml Methanol gelöst. Die entstandenen schwach gelben Flecke konnten häufig erst unter der UV-Lampe abgegrenzt werden. Diese Farbreaktion ist übrigens allen Δ^4 -3-oxo-Steroiden gemeinsam. Außer durch Farbreaktionen konnte die Lage von Testosteron und Androstendion wegen ihrer Doppelbindungen mit Hilfe der UV-Kontaktphotographie nachgewiesen werden. Dies erlaubte Mischchromatogramme mit den beiden Metaboliten.

B) Gesättigte Oxo-Steroide.

Die 17-oxo-Steroide mit benachbarter CH_2 -Gruppe wurden mit Hilfe der Zimmermann-Reaktion (19) nachgewiesen. Von den verwendeten Standards reagieren also die Dioxo-monohydroxy-monoketo-Metabolite. Der Streifen wurde zuerst durch alkoholische KOH (2,5 g KOH in 20 ml Äthylalkohol) gezogen, leicht abgetupft und anschließend mit einer Lösung von 500 mg m-Dinitrobenzol in 25 ml absolutem Äthylalkohol befeuchtet. Die entstandenen Farbflecken waren zunächst dunkelviolett, später bräunlich. Die Empfindlichkeit der Reaktion ist groß.

γ) Dihydroxy- C_{19} -Steroide.

Der Teststreifen wurde mit einer Lösung von 5 g Antimontrichlorid in 25 ml trockenem Chloroform (20) getränkt. Nach anschließendem Erhitzen (3 min) auf 90° im Trockenschrank traten rotviolette Flecken auf. Die Farbreaktion war nicht immer mit Sicherheit zu erhalten.

e) Mikrochemische Reaktionen.

α) Oxydation mit CrO_3 . (21)

Chromtrioxyd oxydiert die Hydroxylgruppen unabhängig von ihrer sterischen Anordnung, jedoch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Da auf diese Weise alle α- oder β-ständigen Hydroxylgruppen in Oxogruppen überführt werden, erhält man nach Oxydation in der Regel metabolitärmere Chromatogramme. Alle gesättigten Testosteronmetabolite mit Sauerstofffunktionen in Stellung 3 und 7 gehen hierbei in 5α- oder 5β-Androstandion über. Die entsprechenden ungesättigten Derivate mit einer Δ^4 -Doppelbindung werden dagegen in Δ^4 -Androst-4-en-3,17-dion umgewandelt.

Die radiopapierchromatographisch ermittelten Zonen wurden einzeln mit Methanol/Chloroform 1:1 eluiert und die organischen Extrakte eingedampft. Zur eingedampften Substanz gaben wir 0,2 ml Eisessig, dazu 0,1 ml Chromtrioxydlösung (400 mg CrO_3 in 20 ml 90 % Essigsäure), schüttelten 5 Minuten und ließen das Oxydationsmittel 16 Std. einwirken. Danach wurden 3 ml Wasser zugeben und dreimal mit je 10 ml Äther extrahiert. Die wässrige Phase wurde verworfen. Die vereinigten Ätherextrakte wurden dreimal mit 2 proz. wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und zweimal mit 3 ml H_2O gewaschen. Der gewaschene Ätherextrakt wurde eingedampft, der Rückstand über Phosphorpentoxyd im Vakuumexsikkator getrocknet und zur Rechromatographie in 0,3 ml Methanol aufgenommen.

B) Girard-Trennung.

Die Girard-Trennung (22) erlaubt eine Differenzierung in Keto- und Nichtketosteroide. Ketonhaltige Steroide vereinigen sich mit Trimethylacetylhydrazid-amoniumchlorid (Girard-Reagenz T) zu wasserlöslichen, in organischen Lösungsmitteln unlöslichen Hydrasonderivaten. Mit Hilfe der Girard-Trennung konnte ermittelt werden, ob die papierchromatographisch aufgetrennten Substanzen nur OF-Gruppen trugen oder ob es sich um Oxo- bzw. Hydroxyoxosteroide handelte.

Den Rückständen wurde 0,5 ml Eisessig und 100 mg Girard-Reagenz T zugesetzt. Nach 15 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 ml Eiswasser und anschließender Neutralisierung mit 10 proz. NaOH unterbrochen. Die Oxosteroid-Girard-Komplexe sind in organischen Lösungsmitteln unlöslich. Daher konnten die nicht

Oxogruppen tragenden Steroide durch dreimaliges Ausschütteln mit je 20 ml Äther entfernt werden. Die vereinigten Ätherextrakte wurden mit 10 ml Eiswasser reextrahiert und zweimal mit je 10 ml 2,5 proz. wässriger Na_2CO_3 -Lösung, sowie dreimal mit je 10 ml Wasser bei höchstens $+ 4^\circ\text{C}$ gewaschen. Die Waschflüssigkeiten wurden verworfen. Die komplexhaltige, wässrige Phase wurde mit 3 ml konz. HCl versetzt, um die entstandenen Hydrazone wieder zu spalten. Die durch die HCl-Hydrolyse entstandenen freien Ketone wurden nach 2 Stunden 3 mal mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt und wie oben gewaschen.

f) Radioaktivitätsbestimmungen.

Radioaktivitätsbestimmungen wurden mit dem Radiopapierchromatographen der Firma Friesecke und Höpfer und mit dem Flüssigszintillationsspektrographen der Firma Packard durchgeführt. War die eingesetzte Radioaktivitätsmenge größer als etwa 3.000 Ipm, wurde der Radiopapierchromatograph eingesetzt. Hierzu wurde der entwickelte Mittelstreifen des jeweiligen Chromatogramms verwendet. Vorteile dieser Meßmethode bestanden einmal in der direkten graphischen Aufzeichnung der vorhandenen Impulse und zum anderen in der Möglichkeit, das Chromatogramm anderweitig zu verwenden. Kleinere Impulsmengen konnten dagegen noch gut mit dem Flüssigszintillationsspektrometer erfaßt werden, mit dem erwähnten Nachteil, daß das Chromatogramm hierbei verbraucht wurde. Zur Messung wurde der Mittelstreifen in 1 cm breite Stücke geschnitten und jedes Stück in ein Meßgefäß (Vial) mit Szintillatorlösung gegeben. Zusammensetzung der Lösung: 0,02% o,4-bis-2(4-Methyl-5-Phenylloxazolyl)-Benzol und 2 g 2,5-Diphenyl-

oxazol in 500 ml Toluol. Die vom Gerät gemessenen Aktivitäten der Stücke wurden auf einen Registrierstreifen gedruckt und später in ein Diagramm eingetragen.

5. Anfertigung von Massenspektren der verwendeten Referenzsubstanzen.

a) Gerät und Einsatz.

Zur Verfügung stand das Massenspektrometer CH 4 der Firma Varian

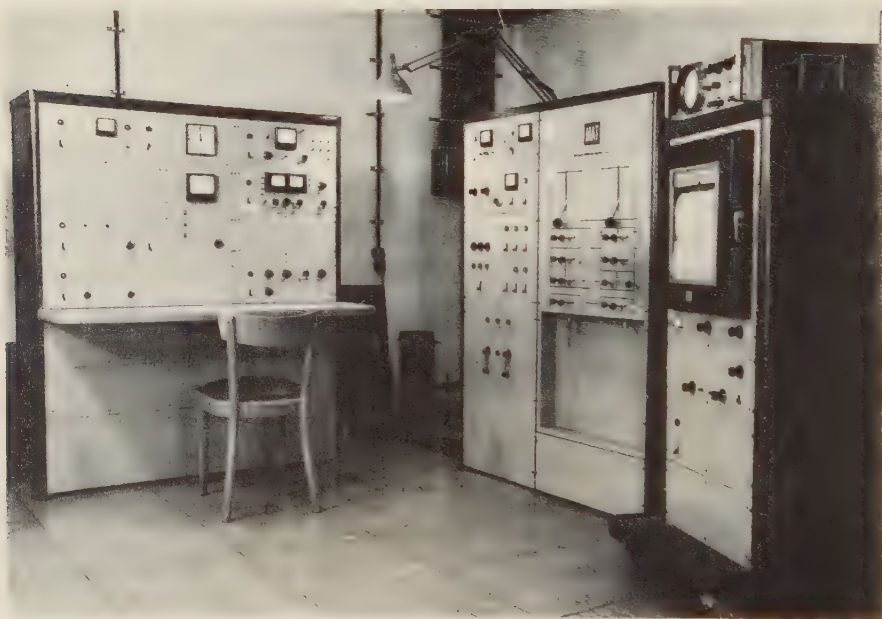


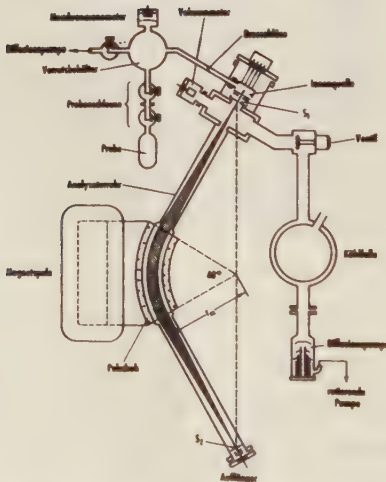
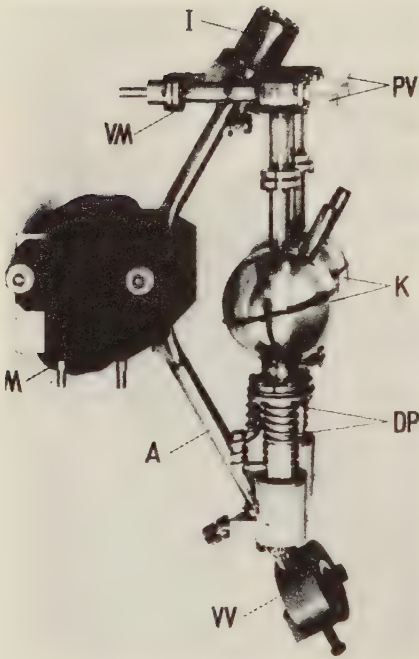
Abb. 2 Ansicht des verwendeten Massenspektrometers (Typ CH 4, Firma Varian MAT). Links: Bedienungsteil, mitte: Trennteil, rechts: Schreiber.

MAT, Bremen. Der Typ CH 4 ist ein 60° Sektorfeld-Massenspektrometer. Es besteht aus 3 Teilen: Dem Trennteil, dem Bedienungsteil und dem Schreiber. Zum Trennteil gehören ua. Ionenquelle, Hochvakuumsystem, Auffänger bzw. Sekundärelektronenvervielfacher sowie die magnetischen und elektrischen Linsensysteme. Zum Bedienungsteil zählen Ionisierungsgerät, Hochspannungsgerät, Magnetstromregler, SEV-Betriebsgerät, Netzverteiler und Massenbereichswähler.

Die zu untersuchende Substanz wird in den nur wenige mm^3 fassenden Tiegel gebracht, der in eine stufenlos heizbare Wolframspirale des Ofeneinsatzes eingesetzt wird. Die erhitzte Substanz verdampft und tritt in den Stoßraum über. Hier wird das Gas einem Elektronenstrahl ausgesetzt, der nach seinem Austritt aus einer Glühkathode eine Spannung von 50 bis 100 V durchläuft. Ein Teil der im Stoßraum befindlichen Moleküle wird durch den Elektronenstoß ionisiert. Es entstehen fast ausschließlich positive Ionen. Bei vielatomigen Molekülen werden neben den Molekülionen auch Ionen von Molekülbruchstücken gebildet. Durch eine Kombination von Zieh- und Focussierelektroden werden die gebildeten Ionen aus dem Stoßraum abgezogen. Sie durchlaufen ein homogenes magnetisches Feld, in dem sie eine kreisförmige Ablenkung senkrecht zu den Feldlinien und senkrecht zur jeweiligen Bewegungsrichtung erfahren. Die massentrennende Wirkung des magnetischen Feldes kommt dadurch zustande, daß Ionen verschiedener Massen, verschiedener Energie und verschiedener Ladung das Magnetfeld mit verschiedenen Bahnradien (Kreissektoren) durchlaufen. Am Ende des Sektorfeldes befindet sich ein Austritts-

Abb.3 60°-Sektorfeld-Massen-spektrometer (Typ CH 4 d der Fa. Varian MAT) außer halb des Gestells. I = Ionenquelle, M = Elektromagnet, A = Analysatorrohr, VV = Vorverstärker für Ionenstrommessung, VM = Vakuummeter, PV = Pumpventile, K = Kühlfallen, DP = Diffusionspumpen.

Abb.4 Schema eines 60°-Sektorfeld-Massenspektrometers
 S_1 = Eintrittsspalt,
 S_2 = Austrittsspalt.



Beide Abbildungen sind dem Band "Massenspektrometrie" von Brunnee/Voss-hage, Verlag Karl Thiemeig, München, entnommen.

spalt, der nur ein Bündel von Ionen einheitlicher Masse durchläßt, sodaß über einen Auffänger und ein angeschlossenes Meßgerät der Ionenstrom des einzelnen Bündels gemessen werden kann. Durch kontinuierliche Veränderungen der magnetischen Kraftflußdichte der Elektromagnete und der damit einhergehenden Veränderung der Bahnradien der verschiedenen Ionenarten, kann man zeitlich nacheinander die den verschiedenen Ionenbündeln zugehörigen



Abb. 5 Ausschnitt
aus einem Massen-
spektrum des Testo-
sterons.

elektrischen Ströme zur Anzeige bringen. Die Peakhöhen in einem solchen Massenspektrum sind direkt proportional der relativen Häufigkeit, mit welcher die entsprechenden Ionen gebildet werden.

Die Ionenströme am Ausgang des Analysators des Massenspektrometers liegen im Bereich zwischen 10^{-8} und 10^{-16} A. Zur Analyse dieser kleinen Ströme sind besondere Nachweiseinrichtungen erforderlich. Das hier verwendete Gerät arbeitet nach der Auffängermethode. Zur Vergrößerung der Nachweiselmpfindlichkeit wurde zur Vorverstärkung ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) verwendet.

Alle Arbeitsgänge finden im evakuierten Massenspektrometer statt (10^{-6} Torr). Zwei Gründe machen die Evakuierung notwendig. Erstens sollen neben den Ionen der zu untersuchenden Substanzen nicht gleichzeitig auch in großer Menge Stickstoff und Sauerstoffionen erzeugt werden, die das Spektrum der Probe stören. Zweitens dürfen die gebildeten Ionen auf ihren Bahnen nicht mit Molekülen zusammenstoßen. Bei solchen Stößen würden die Teilchen von ihrer Sollbahn abgelenkt, sodaß eine klare Trennung der einzelnen Massenpeaks nicht zu erreichen wäre. Der Druck außerhalb des Stoßraums der Ionenquelle muß im allgemeinen unter 10^{-6} Torr liegen. Zur Vakuumerzeugung werden Quecksilber- oder Öldiffusionspumpen verwendet.

Da die zur Verfügung stehende Apparatur zunächst nicht mit einer Vakuumschleuse versehen war, bedeutete ein Probenwechsel die Aufhebung des Vakuums. Das Belüften, Öffnen, Verschließen und Wiederauspumpen des gesamten Systems war außerordentlich

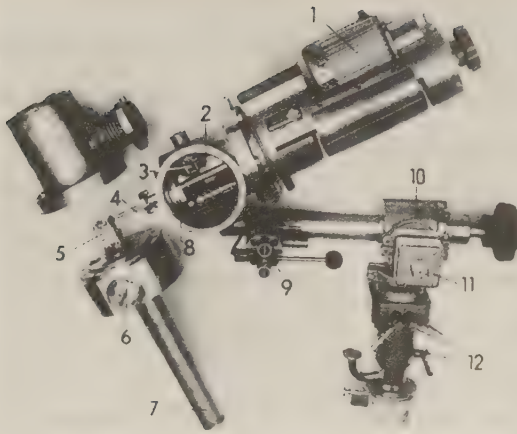


Abb. 6 Ansicht der Vakuumschleuse. 1 = Motor, 2 = Schubstange, 3 = Aufnahme für einen Einsatz zum Vorheizen in der Schleusen-kammer, 4 = Ionenquelleneinsatz, 5 = Ionenquellenkörper, 6 = Pumpanschluß, 7 = Trennrohr, 8 = Abschlußventil, 9 = Vorvakuumventil, 10 = Hochvakuumventil, 12 = Diffusionspumpe.

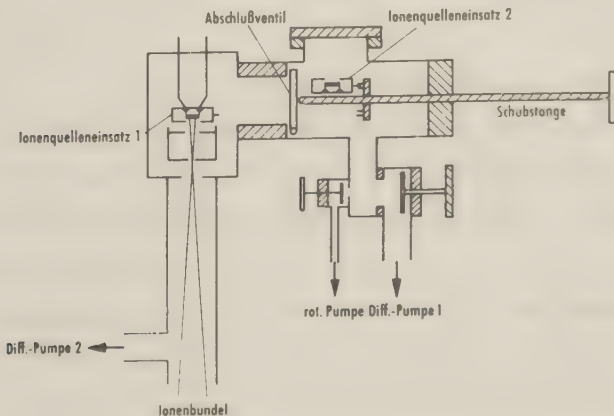


Abb. 7 Schema einer Vakuumschleuse.

Beide Abbildungen entstammen dem auf S. 28 angegebenen Band.

zeitraubend. Es bestand außerdem die Gefahr, die sehr empfindlichen Teile der Ionenquelle und der Ofenschleuse zu beschmutzen oder zu verletzen. Darüberhinaus war man nie sicher, ob beim erneuten Auspumpen ein genügendes Vakuum erzielt werden konnte, da schon ein geringes Verrutschen der zur Abdichtung verwendeten Silberringe die Qualität des Vakuums derart beeinträchtigte, daß häufig ein erneutes Öffnen notwendig wurde.

Durch den nachträglichen Einbau einer Vakuumschleuse wurde der Probenwechsel vereinfacht. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen Schema und Ansicht einer solchen Schleuse. Mit Hilfe einer von außen beweglichen und durch eine vakuumdichte Führung laufenden Schubstange konnte jetzt der Ionenquelleneinsatz, der die Probe- und Verdampfungsvorrichtung enthält, leicht aus dem Ionenquellenaufbau herausgezogen und wieder eingesetzt werden. Leider konnte die durch den späten Einbau der Schleuse erreichte sehr erhebliche Arbeitserleichterung für diese Arbeit nicht mehr genutzt werden.

b) Beispiele für Referenzsubstanzen.

Die Massenspektren der Steroidhormone sind im Bereich bis zur Masse von etwa 200 sehr linienreich. Es ist sehr schwierig, diese meist in Gruppen auftretenden Linien richtig zu interpretieren. In der Folge sei daher nur ein Massenspektrum, das der Ausgangssubstanz Testosteron, ungekürzt wiedergegeben, die Spektren der übrigen Metabolite dagegen nur im Bereich der Massen größer als 200. Dieser Bereich ist deswegen wichtig, weil er den Molekularpeak sowie die OH-, H₂O- und CH₃-freien Bruchstücke enthält. Dem Molekularpeak kann unmittelbar die Zahl der

Sauerstoff- und Wasserstoffatome entnommen werden.

Die Spektren der Referenzsubstanzen wurden nach Polarität geordnet. Außer Testosteron (vollständiges Spektrum) wurden folgende Metabolite berücksichtigt:

5 β -Androstan-3,17-dion (Abb. 8)

Androst-4-en-3,17-dion (Abb. 9)

5 β -Androstan-3 α -ol-17-on (Abb. 10)

Testosteron (Abb. 11, vollständiges Spektrum)

5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol (Abb. 12)

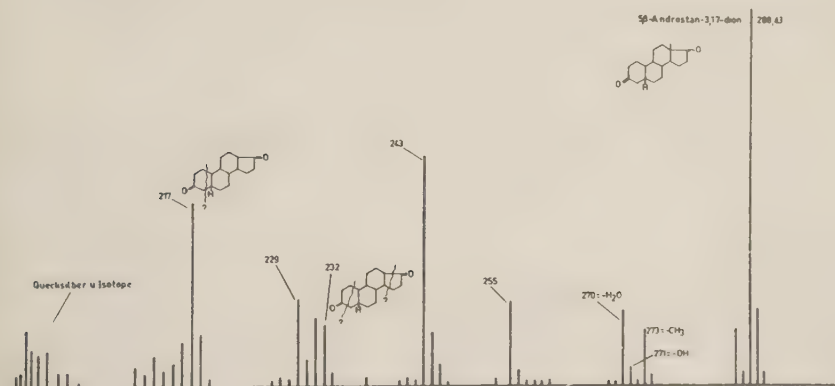


Abb. 8 Gekürztes Spektrum von 5 β -Androstan-3,17-dion.

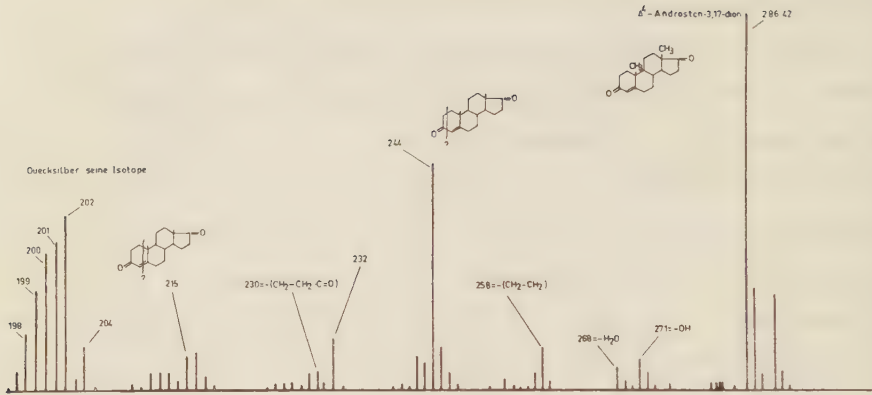


Abb. 9 Gekürztes Massenspektrum von Androst-4-en-3,17-dion

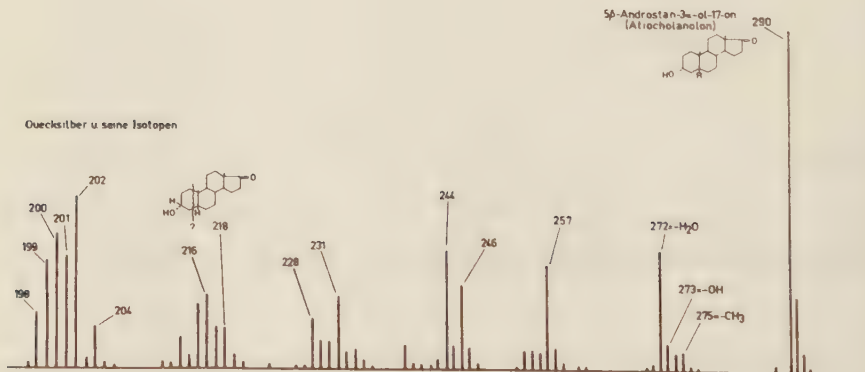
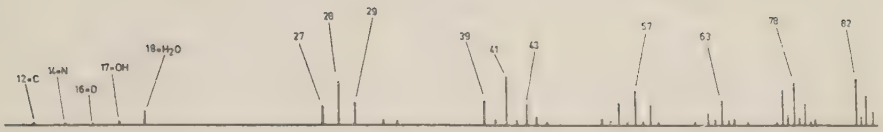
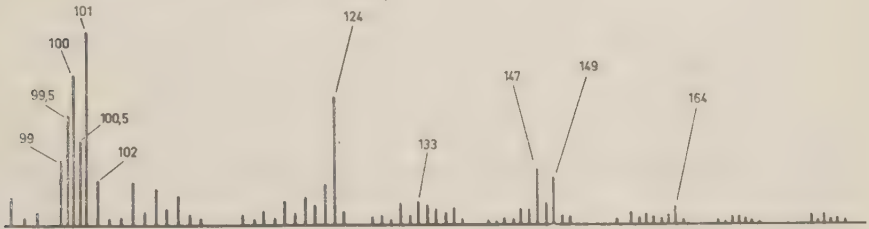


Abb. 10 Gekürztes Massenspektrum von 5β-Androstan-3α-ol-17-on



Quecksilber u. seine Isotope
(zweifach ionisiert)

möglicherweise



Quecksilber u seine Isotope

Testosteron

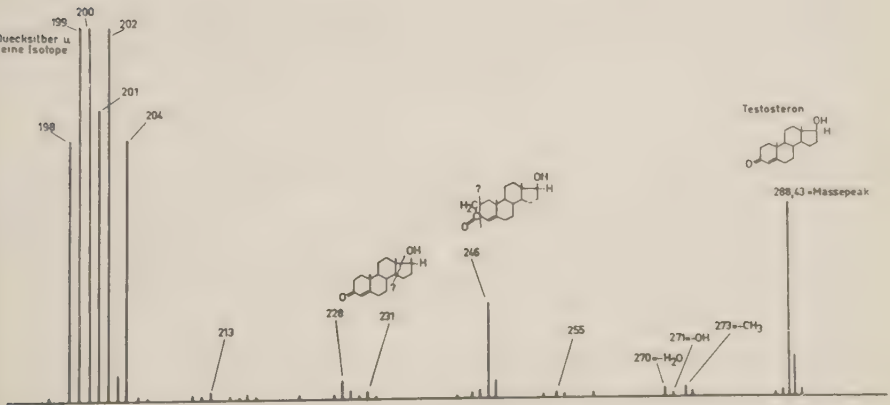


Abb. 11 Vollständiges Massenspektrum von Testosteron

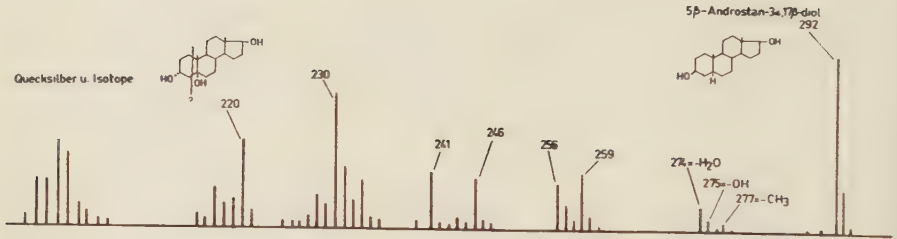


Abb. 12 Gekürztes Massenspektrum von 5β-Androstan-3α,17β-diol

B Ergebnisse1. Mengenverhältnisse von freien zu konjugierten Metaboliten in Leber und Niere.

In der Leber betrugen die Gesamtmetabolite unter den im methodischen Teil angegebenen Bedingungen 400.100 dpm/g Organ. Hier- von entfielen 33 % auf die freien Metabolite und 67 % auf die Konjugate. Demgegenüber lagen in der Niere Gesamtmetabolite mit

dpm/1g Organ (%)

	Gesamt- Metabolite	freie Metabolite	Gesamt- Konjugate	Glucu- ronide	lipophile Konjugate	Sulfate
Leber	400 100	133 900 (33)	266 200 (67)	26 300 (23)	52 900 (20)	151 000 (57)
Niere	249 600	159 300 (64)	90 300 (36)	12 500 (14)	14 700 (16)	63 100 (70)
Lunge	110 000	96 300 (87)	14 300 (13)	3 050 (21)	2 050 (14)	9 200 (64)
Thymus	44 900	41 800 (93)	3 100 (7)	← 24 00 (77) →		700 (23)
Blut	Plasma	194 000	119 300 (62)	74 700 (38)	63 700 (85)	6 000 (8)
	Korp.E.	82 300	55 000 (67)	27 300 (33)	18 800 (69)	7 500 (27)

Tab. 1 Absolute (dpm/g Organ) und relative (%) Radioaktivitäts- anteile in einigen Organen 30 Tage alter männlicher Sprague-Dawley-Ratten 15 Minuten nach intraperitonealer Injektion von je 20 μ c Testosteron-4-¹⁴C (200 μ g) in 5 Tiere, aufgegliedert nach Gesamtmetaboliten, freien Metaboliten, Gesamtkonjugaten, Glukuroniden, lipophilen Konjugaten und Sulfaten.

einer Aktivität von 249.600 dpm/g Organ vor. Hier ist das Verhältnis der Anteile an freien Metaboliten und Konjugaten entgegengesetzt zur Leber: 64 % freie Metabolite und 36 % Konjugate.

In unseren Labors wird zur Zeit in größerem Umfange über Mengenverhältnisse einzelner Konjugatarten untereinander in verschiedenen Organen gearbeitet. Daher sollen in Tabelle 1 die eigenen Ergebnisse in Zusammenhang mit anderen Ergebnissen aus unserer Abteilung dargestellt werden.

Besonders bemerkenswert ist 1. die Tatsache, daß der Konjugatgehalt von Organ zu Organ sehr unterschiedlich ist und 2., daß im Unterschied zum Blutplasma (und auch Urin) in den Organen die schwefelhaltigen Konjugate (Sulfate, Sulfatide) eine wesentlich größere Rolle spielen als die Glukuronide.

2. Freie Metabolite.

a) Mengenverhältnisse hoch und niederpolarer Metabolite.

Es ist von Interesse zu vergleichen, in welchem Umfange in den einzelnen Organen die drei grundlegenden Reaktionsarten von Steroidhormonen beschriften wurden. Diese 3 Reaktionsarten seien noch einmal kurz charakterisiert:

1. Konjugatbildung

2. Hydrierungen und Dehydrierungen

3. Hydroxylierungen.

Der Umfang der Konjugatbildung bei den einzelnen Arten wurde im vorigen Abschnitt behandelt.

Da gesättigte Dihydroxy-C₁₉-Steroide, wie noch gezeigt werden wird, in Leber und Niere kaum in Erscheinung treten, kommen

hydrierte und dehydrierte Metabolite (Androst-4-en-3,17-dien, gesättigte Monohydroxy-monoxo-C₁₉-Steroide und Dioxo-C₁₉-Steroide) nur in den Bereichen der Papierchromatogramme vor, die weniger polare Metabolite als Testosteron enthalten. Bei den Metaboliten im polaren Bereich dürfte es sich fast ausschließlich um solche handeln, die durch Hydroxylierungsreaktionen entstanden sind. Es ist daher sinnvoll, die Radioaktivitätsanteile aller Metabolite polarer als Testosteron mit denen des Testosterons ins Verhältnis zu setzen (Tab. 2).

Chromatogramm	Metabolite polarer als Testosteron	Testosteron	Metabolite weniger polar als Testosteron
Leber, freie Metabolite	8,9	1	2,1
Niere, freie Metabolite	1,1	1	0,9
aus Konjugaten Leber, freigesetzte Metabolite	6,3	1	4,0
aus Konjugaten Niere, freigesetzte Metabolite	6,2	1	1,0

Tab. 2 Quotienten der Radioaktivitätsanteile aller Metabolite, die polarer als Testosteron sind und derjenigen, die weniger polar sind, bezogen auf den Radioaktivitätsanteil des Testosterons = 1.

Die Zahlen der Tabelle 2 lassen sofort erkennen, daß in der Leber die Hydroxylierungsreaktionen eine wesentlich größere Rolle spielen als in der Niere. Umgekehrt wird deutlich, daß Hydrierungen und Dehydrierungen in der Niere im Vordergrund stehen. Letzteres kann eine Folge einer geringeren Aktivität der hydroxylierenden Enzyme sein. Es ist klar, daß demzufolge andere Reaktionen beschränkt werden, selbst dann wenn die Aktivitäten solcher Enzyme (Dehydrogenasen) nicht sonderlich hoch sind.

b) Einzelmetabolite in der Leber.

Das System Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 67:33:80:20, das besonders geeignet für Übersichtschromatogramme ist, ergab folgendes Bild:

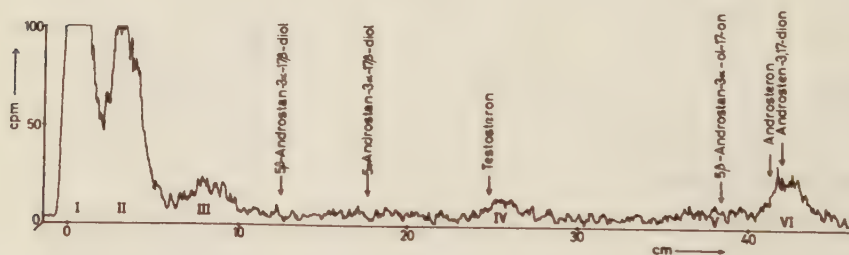


Abb. 13 Radiopapierchromatogramm der freien Metabolite von Testosteron-4- ^{14}C in der Leber 30 Tage alter männlicher Sprague-Dawley-Ratten 15 Minuten nach intraperitonealer Injektion von je 20 μC (200 μg) in 5 Tiere; Laufmittel Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 67:33:80:20, 4 Std. absteigend, Whatman II, 50.000 dpm; die eingezeichneten Standards liefen auf Nebenbahnen.

Im hochpolaren Bereich treten 3 radioaktive Zonen auf (I,II,III), die eine Rechromatographie erfordern. Sie enthalten den Hauptanteil der Radioaktivität. In der Mitte des Chromatogramms liegt eine schwache radioaktive Zone bei Testosteron (IV). Im niederepolaren Bereich erkennt man 2 radioaktive Zonen, eine schwächere bei Ätiocholanolon bzw. Androstanolon (V) und eine stärkere bei Androsteron bzw. Androst-4-en-3,17-dion (VI).

Die Radioaktivitätszone bei Testosteron (IV) wurde eluiert, mit CrO_3 oxydiert und erneut im System Heptan/Benzol/Methanol/Wasser chromatographiert. Die Registrierung mit dem Radiopapierchromatographen ergab erwartungsgemäß keinen Peak. Bei Auswertung der Streifen im Flüssigszintillationsspektrometer trat jedoch Radioaktivität bei Androstendion in Erscheinung.

Die Zonen V und VI erforderten eine besondere Chromatographie mit Methylcyclohexan/Butandiol. Mit diesem System gelingt es zwar nicht, 5 β -Androstan-3 α -ol-17-on und 5 α -Androstan-17 β -ol-3-on voneinander zu trennen, wohl aber Androst-4-en-3,17-dion und 5 α -Androstan-3 α -ol-17-on (Androsteron). Da diese 4 Metabolite im System Methylcyclohexan/Butandiol getrennt von anderen Metaboliten auftreten, konnte an Stelle einer Rechromatographie der Zonen V und VI, Abb.13, eine Chromatographie mit dem Stammextrakt durchgeführt werden. Abb. 14 zeigt das Ergebnis.

Wesentliche Erkenntnis aus Abb. 14 ist die Tatsache, daß Androstendion fehlt. Die Zone VI der vorher gegebenen Abb. 13 repräsentiert daher ausschließlich Androsteron. Die Radioaktivitätszone dicht vor dem Androsteron (Abb. 13 und 14) ist wesentlich kleiner, auch bleibt zunächst offen, ob es sich um Ätio-

cholanolon oder Androstanolon handelt.

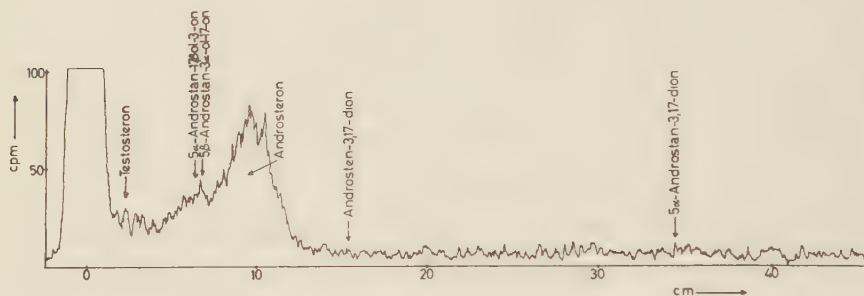


Abb. 14 Radiopapierchromatogramm der freien Metabolite von Leber; physiologische Bedingungen und Applikation wie bei Abb. 13; Laufmittel Methylcyclohexan/Butandiol 5:1, 11 Stunden, absteigend, Whatman I.

Die Gegenwart von Androsteron wird also zunächst durch Chromatographie in 2 verschiedenen Systemen erhärtet. Außerdem ergibt die fragliche Radioaktivitätszone nach Oxydation mit CrO_3 Androstandion (Abb. 15). Das Auftreten von ~~5~~(β)-Androstan-3,17-dion nach Oxydation ist zwar kein hinreichender Beweis für die Existenz von Androsteron, wohl aber eine notwendige Voraussetzung hierfür. Auch die Existenz von Ätiocholanolon bzw. Androstanolon ließ sich durch 2 papierchromatographische Systeme erhärten. Um die Frage Ätiocholanolon oder Androstanolon zu entscheiden, wurde IVT mit 20 mg Ätiocholanolon ausgeführt. Die Impulsraten der Kristallisate in dpm/ng betrugen:

1.) 22 2.) 18 3.) 20 4.) 22.

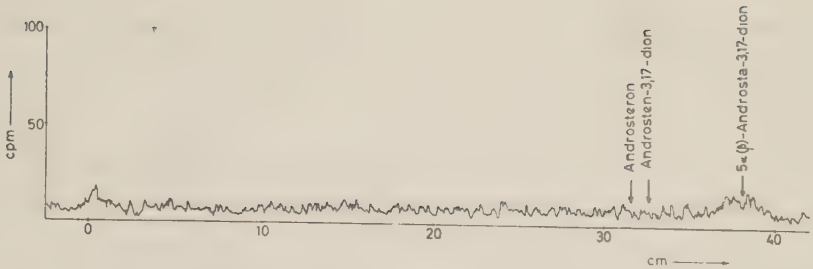


Abb. 15 Rechromatographie der Radioaktivitätszone VI aus Abb. 13 in Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 67:33:80:20 nach Oxydation mit CrO_3 ; übrige Bedingungen wie Abb. 13.

Eine IVT mit Androstanolon wurde hier nicht durchgeführt. Das geschah von anderer Seite in unserer Abteilung (unveröffentlicht). Dieser Test verlief negativ.

Die hochpolaren Metabolite aus Abb. 13 wurden eluiert und im System Cyclohexan/Toluol/Methanol/Wasser rechromatographiert. Die Abb. 16 zeigt das Ergebnis nach dreistufigem Lauf. (Je 4 Stunden; Laufrfront 1 cm vor Papierende).

Bemerkenswert ist, daß die stärkste radioaktive Zone in Abb. 16 mit keiner der hochpolaren Testosteronmetabolite übereinstimmt, die bisher bei Stoffwechselstudien mit Testosteron gefunden wurden. Als bevorzugte Hydroxylierungsprodukte des Testosteron gelten: 2 β -, 6 β -, 7 α -, 11 β - und 16 α -Testosteron bzw. Androstendion (23). Wir können mit Sicherheit sagen, daß diese Metabolite unter unseren in-vivo-Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Die erwähnte starke Radioaktivitätszone liegt zwischen 11 β -HO- und 2 β -HO-Testosteron. Bei näherer Be-

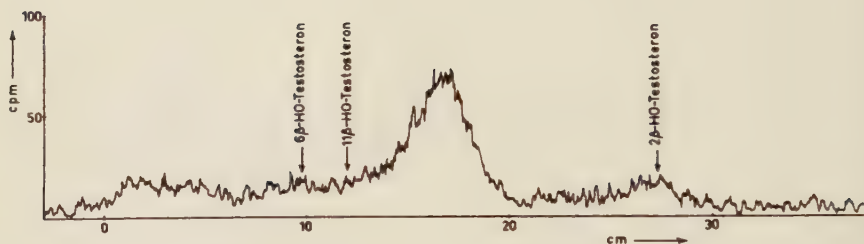


Abb. 16 Rechromatogramm der Zonen I, II und III von Abb. 13 in Cyclohexan/Toluol/Methanol/Wasser 5:5:7:3, Whatman II, absteigend, 3-facher Lauf zu je 4 Stunden; Bedingungen wie bei Abb. 13.

trachtung fällt auf, daß die 3 Radioaktivitätszonen im mittleren Bereich des Chromatogramms jeweils dicht hinter 3 bekannten Hydroxytestosteronen liegen: 6 β -, 11 β - und 2 β -HO-Testosteron. Da die 4,5-Dihydroderivate aller 4 Metabolite durchweg etwas weniger polar sind als die entsprechenden ungesättigten Metabolite, lag der Gedanke nahe, daß es sich bei den 3 Radioaktivitätszonen um 6 β -, 11 β - und 2 β -Hydroxydihydrotestosteron handelt. Die starke Radioaktivitätszone wurde eluiert, eingedampft und in einer Hydrierapparatur mit Palladiumschwarz und Wasserstoff behandelt. (5g PtCl₂ wurden mit 250 ml H₂SO₄ und 2000 ml H₂O bei 80° in Lösung gebracht und nach dem Erkalten im Laufe von 15 bis 30 Minuten unter kräftigem Rühren in 2750 ml 0,2 n Ba(OH)₂ eingetropft. Der hellgraue Katalysator wurde abzentri-

fugiert, mit 3-4 Liter H_2O gewaschen und über P_2O_5 getrocknet. Der Steroidrückstand wurde in 10 ml Methylalkohol und 2 ml 2,5 n KOH gelöst und mit 100 mg Katalysator versetzt. Dann wurde das Reaktionsgefäß an die Hydrierapparatur angeschlossen und mit H_2 begast. Die Aufarbeitung folgte durch Zugabe von 20 ml H_2O und 50 ml Methylenchlorid, indem das Hydrierprodukt aufgenommen wurde. Die Methylenchloridphase wurde neutral gewaschen und eingedampft; dann erfolgte Chromatographie). Rechromatographie des hydrierten Produktes zeigte die gleiche Lage im Chromatogramm wie das Ausgangsprodukt. Damit wurde mit recht großer Sicherheit bewiesen, daß die interessierende Radioaktivitätszone keinem HO-Testosteron oder HO-Androstendion zugeordnet werden kann. Es handelt sich zweifellos um einen gesättigten Metaboliten. Vorläufig müssen wir die Frage offen lassen, ob es sich um ein Hydroxy-dihydro-testosteron oder um ein Hydroxy-5 α (B)-androst-3 α (B)-ol-17-on handelt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß für die beiden kleinen Radioaktivitätszonen hinter 6 β - und 2 β -HO-Testosteron die gleichen Überlegungen berechtigt sind.

Die Abbildung 17 zeigt ein Rechromatogramm der Zonen I und II aus Abbildung 13 im System Benzol/Äthylazetat/Methanol/Wasser 7:3:5:5, Whatman II, absteigend 4 Stunden. Die Hauptzone spannt sich hier zwischen 7 α -Hydroxytestosteron und 2 β -Hydroxytestosteron aus. Es ist bemerkenswert, daß auch eine Reihe noch polarerer Metabolite in Erscheinung tritt, bei denen es sich entweder um Trihydroxyprodukte oder Metabolite mit mehr als 4 Sauerstoffatomen handeln muß.

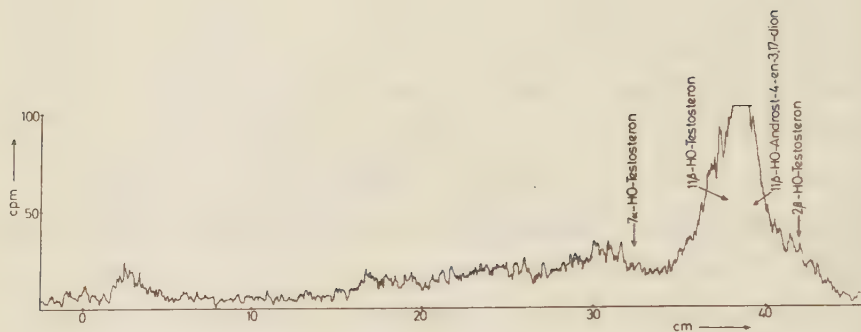


Abb. 17 Rechromatogramm der Zonen I und II aus Abb. 13 im System Benzol/Äthylazetat/Methanol/Wasser 7:3:5:5, Whatman II, absteigend, 4 Stunden.

c) Einzelmetabolite in der Niere.

Wie schon bei den Mengenverhältnissen erwähnt wurde, ist der Anteil an hochpolaren Metaboliten bei der Niere wesentlich geringer als bei der Leber. Abb. 18 zeigt ein Übersichtschromatogramm der freien Metabolite von Niere mit Heptan-Benzol-Methanol-Wasser.

Ein großer Teil der Radioaktivität zeigt den R_F -Wert des Testosterons (Zone II, Abb. 18). Isotopenverdünnungstechnik mit 20 mg Testosteron ergab folgende spez. Aktivitäten in dpm/mg in den einzelnen Kristallisaten:

1.) 32 2.) 36 3.) 30 4.) 34 5.) 36.

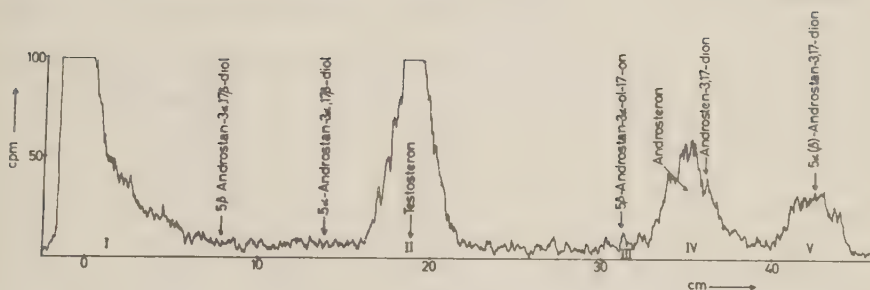


Abb. 18 Radiopapierchromatogramm der freien Metabolite von Testosteron-4- ^{14}C in der Niere 30 Tage alter männlicher Sprague-Dawley-Ratten 15 Minuten nach intraperitonealer Injektion von je $20\mu\text{C}$ ($200\mu\text{g}$) in 5 Tiere; Laufmittel Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 67:33:80:20, 4 Std. absteigend, Whatman II, 50.000 dpm; die eingezeichneten Standards liefen auf Nebenbahnen.

Damit dürfte das Vorliegen von Testosteron gesichert sein. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, daß in der 1. Mutterlauge erheblich mehr Aktivität vorlag, als der gelösten Kristallmenge entsprach. Somit muß damit gerechnet werden, daß ein anderer Metabolit als Begleiter vorhanden ist, möglicherweise Epitestosteron.

Die Zone III, Abb. 18, ist sehr schwach radioaktiv. Ätiocholanolon bzw. Androstanolon dürften daher unter den Nierenmetaboliten keine Rolle spielen.

Die Zone IV, Abb. 18, mit deutlicher Radioaktivität entstammt etwa zu gleichen Teilen Androsteron und Androstendion. Das läßt sich mit Hilfe von Chromoxydation der eluierten Zone IV und anschließender Rechromatographie in Heptan/Benzol/Methanol/Wasser zeigen (Abb. 19).

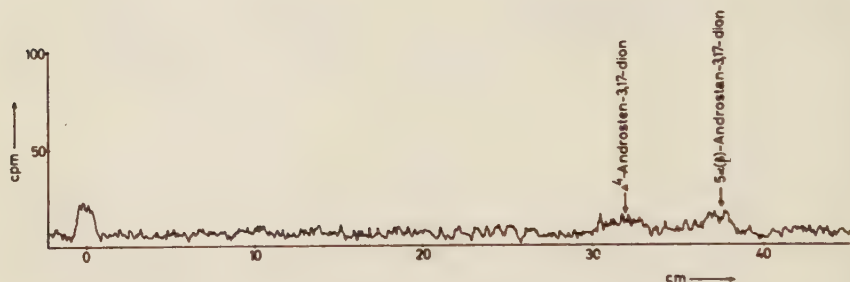


Abb. 19 Rechromatographie der Zone IV von Abb. 18 mit Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 67:33:80:20 nach Oxydation mit CrO_3 .

Das Chromatogramm, Abb. 19, zeigt zwei gleichstarke Radioaktivitätszonen, eine bei Androstendion, die andere bei Androstandion. Es sei nochmals daraufhingewiesen, daß bei CrO_3 -Oxydation Androsteron zu Androstandion wird und Androstendion unverändert bleibt.

Eine weitere Möglichkeit zu zeigen, daß Androsteron und Androstendion in Zone IV, Abb. 18, vorhanden sind, gelingt mit Hilfe

des Systems Methylcyclohexan-Butandiol (Abb. 20).

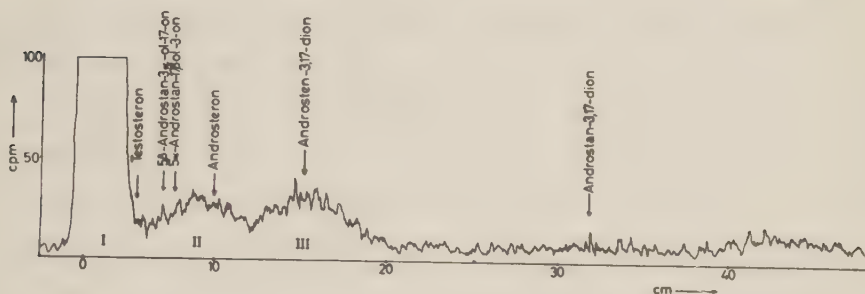


Abb. 20 Radiopapierchromatogramm der freien Metabolite der Niere in Methylcyclohexan/Butandiol, 11 Stunden absteigend, Whatman I; physiologische Bedingungen und Applikation wie bei Abb. 13.

Auch in diesem Chromatogramm sind die beiden Radioaktivitätszonen bei Androsteron und Androstendion etwa gleich stark. Die hochpolaren Metabolite der Niere (Zone I, Abb. 18) ergaben bei dreistufiger Rechromatographie im System Cyclohexan/Toluol/Methanol/Wasser 2 Radioaktivitätszonen im Bereich des Starts. Als HO-Testosterone kommen nur die polarsten, nämlich 7α - und 16α -HO-Testosteron in Frage. Die bei der Leber so charakteristischen hochpolaren Metabolite fehlen bei der Niere.

3. Aus Konjugaten freigesetzte Metabolite.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde auf eine Differenzierung in Glukuronide, Sulfate und lipophile Konjugate verzichtet, da

die Ausarbeitung der entsprechenden Methoden noch nicht abgeschlossen ist. Tabelle 1 ließ erkennen, daß in den Organen, also auch in Leber und Niere, die Sulfate eine wesentlich größere Rolle spielen als die Glukuronide. Die methodischen Schwierigkeiten der Trennung der einzelnen Konjugatgruppen voneinander liegt vor allem bei den lipophilen Konjugaten (Sulfatiden), die sehr instabil sind. Die gesamte Konjugatfraktion wurde also lediglich mit 5 proz. Schwefelsäure 30 min lang bei 80° verseift. Nach den klassischen Arbeiten von Gallagher (24) werden hierbei die Androgene genügend geschont.

Das Metabolitspektrum der aus den Leberkonjugaten freigesetzten Steroide ist aus Abb. 21 zu erkennen.

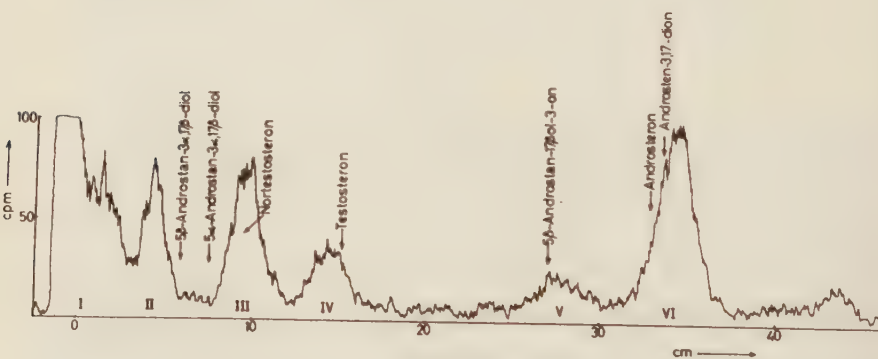


Abb. 21 Radiopapierchromatogramm der aus den Leberkonjugaten freigesetzten Metabolite in Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 66:33:80:20, Whatman II, 4 Std. absteigend; physiologische Bedingungen und Applikation siehe Abb.13.

Wiederum erkennt man eine Reihe radioaktiver Zonen. Die Zonen I und II wurden wie bei den freien Metaboliten in Cyclohexan/Toluol/Methanol/Wasser rechromatographiert. Das Ergebnis war verwandt mit dem bei den freien Metaboliten. Eine Identifizierung war aus den dort erwähnten Gründen vorläufig nicht durchführbar..

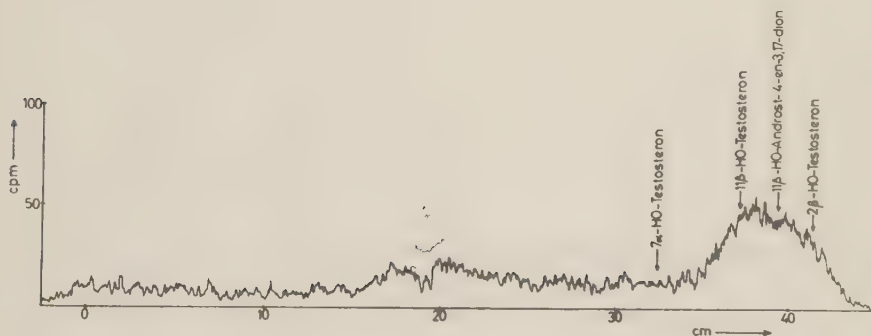


Abb. 22 Rechromatographie der hochpolaren, freigesetzten Metabolite im System Benzol/Äthylazetat/Methanol/Wasser ergab ebenfalls ein ähnliches Bild wie bei den hochpolaren, freien Metaboliten.

Die Zone III, Abb. 21, konnte der Lage nach zu 5α -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol und zu 19-Nortestosteron gehören. Mit beiden Substanzen (je 20 mg) wurden Isotopenverdünnungsanalysen durchgeführt. Beide Tests waren negativ.

Die Zone IV der Abb. 21 dürfte unverändertem Testosteron entstammen und wurde nicht weiter untersucht. Für die schwach aktive Zone V gilt dasselbe.

Die Zone VI, Abb. 21, wurde mit CrO_3 oxydiert und im gleichen System rechromatographiert (Abb. 23). Der einzige radioaktive

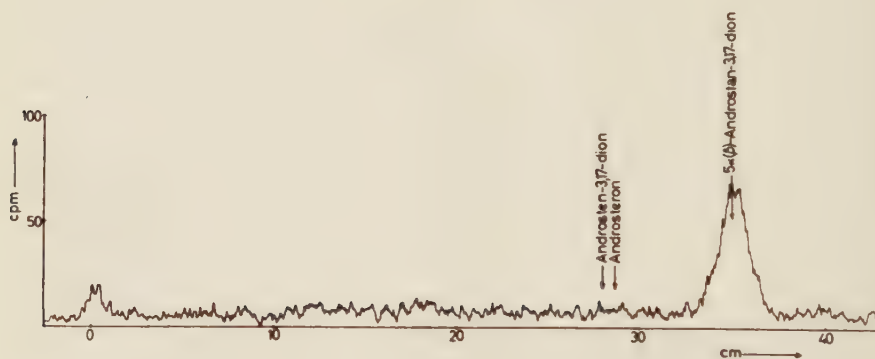


Abb. 23 Rechromatographie der Zone VI aus Abb. 21 nach Oxydation mit CrO_3 im System Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 67:33:80:20, 4 Stunden absteigend, Whatman II.

Gipfel lag bei Androstan-3,17-dion. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß er aus Androsteron hervorgegangen ist. Die Tatsache, daß bei den freigesetzten Metaboliten kein Androsten gefunden wurde, ist hier anders zu interpretieren als bei den freien Metaboliten der Leber. Da Androstendion keine Hydroxylgruppen enthält, kann es auch nicht Konjugate bilden. Die

spezifischen Aktivitäten der einzelnen Kristallisate (dpm/mg) betrugen bei Einsatz von 20 mg Androsteron:

1.) 268 2.) 251 3.) 259 4.) 261.

Eine weitere Stütze für das Vorliegen von Androsteron in den Leberkonjugaten ergab die Chromatographie der freigesetzten Metabolite im System Methylcyclohexan-Butandiol. Hier trat die stärkste Zone bei Androsteron auf, das in diesem System gut abgetrennt werden kann (Abb. 24).

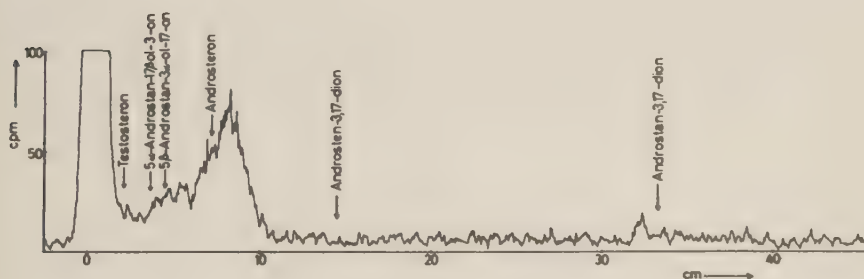


Abb. 24 Radiopapierchromatogramm der aus den Leberkonjugaten freigesetzten Metabolite im System Methylcyclohexan/Butandiol 5:1, 11 Stunden absteigend, Whatman I.

Bei den aus der Niere freigesetzten Metaboliten überwiegen hochpolare Metabolite, deren Identifizierung die erwähnten Schwierigkeiten bereitet (Abb. 25).



Abb. 25 Radiopapierchromatogramm der aus den Nierenkonjugaten freigesetzten Metabolite im System Heptan/Benzol/Methanol/Wasser 67:33:80:20, 4 Std.absteigend, WhatmanII.

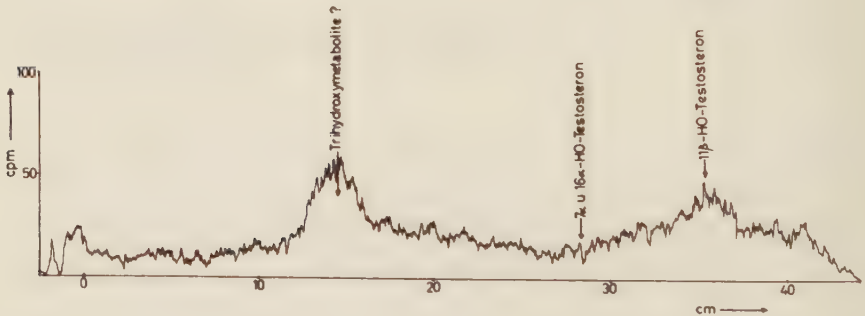


Abb. 26 Rechromatogramm der hochpolaren Zonen I und II aus Abb. 25 im System Benzol/Äthylazetat/Methanol/Wasser 7:3:5:5, 4 Stunden absteigend, Whatman II.

Die Abb. 26 zeigt die Rechromatographie der hochpolaren Zonen I und II von Abb. 25 im System Benzol/Äthylazetat/Methanol/Wasser 7:3:5:5. Sie läßt erkennen, daß speziell in der Niere sehr hochpolare Metabolite in den Konjugaten vorkommen. Diese sind wesentlich polarer als die polarsten Hydroxytestosterone 7α - und 16α -HO-Testosteron. Möglicherweise handelt es sich bei dem "Peak" in der Mitte des Chromatogramms um gesättigte Trihydroxy- C_{19} -Steroide.

Das Spektrum der freigesetzten Metabolite in Abb. 25 weist außerdem noch kleine Aktivitäten bei Testosteron (IV), Ätiocholanolon (V) und Androsteron (VI) auf.

Zusammenfassung

In Leber und Niere 30 Tage alter männlicher Sprague-Dawley-Ratten wurden die initialen Metabolite von Testosteron-4-¹⁴C unter möglichst physiologischen Bedingungen untersucht. Zum Einsatz kamen 2 x 5 Tiere, denen je 20 μ C (200 μ g) des markierten Steroids in 0,2 ml Propylenglykol-Wasser 1:1 subkutan injiziert wurde. Tötung erfolgte 15 Minuten nach Applikation durch Dekapitieren unter Äthernarkose. Trennung und Isolierung der Metabolite von Leber und Niere erfolgte bei beiden Organen unter möglichst gleichen Bedingungen. Bei der Chromatographie wurden jeweils Mengen gleicher Radioaktivität eingesetzt. Auf diese Weise konnte mit Sicherheit gezeigt werden, daß unter den Metaboliten der Leber zum Unterschied zur Niere das Androst-4-en-3,17-dion fehlt. Mit großer Wahrscheinlichkeit fehlen in der Leber auch andere Δ^4 -3-oxo-Metabolite. Damit wurde ein auffallender Unterschied im Verhalten der Leber bei in-vitro- und in-vivo-Versuchen aufgedeckt. Androst-4-en-3,17-dion und andere Δ^4 -3-oxo-Metabolite sind charakteristische Metabolite des Testosterons bei in-vitro-Versuchen mit Homogenaten und Zellfraktionen sowie bei Perfusionsversuchen mit Leber. Offensichtlich spielen auch die Dihydroxy-C₁₉-Metabolite (5 α -Androstan-3 α ,17 β -diol, 5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol) gegenüber in-vitro-Versuchen bei beiden Organen nur eine untergeordnete Rolle.

Hauptmetabolite des Testosterons sind in der Leber Androsteron, 5 β -Androstan-3 α -ol-17-on und eine große Zahl nicht aufgeklärter hochpolarer Metabolite. Letztere sind nicht identisch mit den

aus in-vitro-Versuchen bekannten hochpolaren Metaboliten des Testosterons: 2 β -, 6 β -, 7 α -, 11 β - und 16 α -Testosteron bzw. Androstendion. Wahrscheinlich handelt es sich um gesättigte Steroide mit mindestens drei Sauerstoffatomen. Die Hauptmetabolite der Niere sind neben unverändertem Testosteron Androsteron, Androst-4-en-3,17-dion und 5 β -Androstan-3 α -ol-17-on.

Von allen erwarteten Metaboliten wurden Massenspektren angefertigt und der Versuch gemacht, sie bei der Identifizierung zu verwerten. Die vorhandene Ausrüstung war jedoch noch nicht empfindlich genug, um die bei den in-vivo-Versuchen auftretenden Metabolitmengen zu erfassen. Daher wurde die Identifizierung mit der Isotopenverdünnungstechnik abgeschlossen.

Literaturverzeichnis

1. P. Karlson Mechanisms of hormone action,
Thieme Verlag, Stuttgart und
Academic Press, New York, 1965
2. K.-O. Mosebach 13. Symposion der deutschen
Gesellschaft für Endokrinologie,
S. 17-31, Springer-Verlag,
Berlin-Heidelberg-New York 1968
- W. Dirscherl u. K.-O. Mosebach Acta endocrinol. (Copenhagen)
36, 115 (1961)
- K.-O. Mosebach, W. Dirscherl ebenda 44, 416 (1963)
- u. T. El-Attar
- T. El-Attar, K.-O. Mosebach ebenda 45, 437 (1964)
- u. W. Dirscherl
- T. El-Attar, W. Dirscherl ebenda 45, 527 (1964)
- u. K.-O. Mosebach
- K.-O. Mosebach u. W. Dirscherl ebenda 47, 51 (1964)
- K.-O. Mosebach, W. Dirscherl Hoppe-Seylers Z. physiol. Chemie
344, 197 (1966)
- K. Rath u. G. Riek
- K.-O. Mosebach, H. Jühe u. Acta endocrinol. (Copenhagen)
u. W. Dirscherl 54, 557 (1967)
3. C.D. Kochakian, G. Costa u. Endocrinology 70, 99, 175 (1962)
J. Hill
4. R.J. Dorfman and F. Ungar Metabolism of steroid hormones,
New York-London, Academic Press
1965

5. siehe unter 2.
6. A. Butenandt, Hoppe-Seylers Z. physiol.Chemie 234, 233 (1935)
7. K.-O. Mosebach, W.Dirscherl ebenda 344, 197 (1966)
K. Rath u. G. Rieck
8. T.F. Gallagher, D.K. Fukushima Rec. Progr. Hormone Res.,
M.C. Barry and K. Dobriner 6, 131 (1951)
9. M.C. Barry, M.L. Edinoff, Endocrinology 50, 587 (1952)
K. Dobriner and T.F. Gallagher
10. J. Ashmore, W.H. Elliot, J. biol. Chem., 200, 661 (1953)
E.A. Doisy jr. and E.A. Doisy
11. W. Dirscherl u. K.-O. Mosebach Acta endocrinol. (Copenhagen)
36, 115 (1961)
12. D.D. van Slyke, R. Steele u. J. biol. Chem., 192, 769 (1951)
J. Plazin
13. W. Bernstein u. R. Ballentine Rev. Sci. Instr. 20, 347 (1949)
14. C.J. Migeon in "Hormone in Humanplasma",
S. 297, Ed. Little, Brown &
Comp., Boston 1960
15. I.E. Bush Biochem. J. 50, 370 (1952)
16. T. El-Attar, W. Dirscherl u. Acta endocrinol. (Copenhagen)
K.-O. Mosebach 45, 527 (1964)
17. K. Savard J. biol. Chem., 202, 457 (1953)
18. L. Smith u. T. Foell Analytic. Chem. 31, 102 (1959)
19. K. Savard J. biol. Chem. 202, 457 (1953)
20. R. Neher u. A. Wetterstein Helv. chim.Acta 34, 2278 (1951)
21. A. Zaffaroni u. R.B. Burton J. biol. Chem. 193, 749 (1951)

22. G. Pincus u. W.H. Pearlman Endocrinology 29, 413 (1941)
23. R.J. Dorfman and F. Ungar Metabolism of steroid hormones,
New York-London, Academic Press
1965
24. T.F. Gallagher, D.k. Fukushima Rec. Progr. Hormone Res.,
M.C. Barry and K. Dobriner 6, 131 (1951)

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Karl-Oskar M o s e b a c h

danke ich herzlich für die Überlassung des Themas.

Gerne erinnere ich mich an den immer hilfreich gewährten Rat, das angenehme Arbeitsklima und das stets freundliche Entgegenkommen der Mitarbeiter.

Lebenslauf

Am 1.7.1935 wurde ich als Sohn des Schlossers Adolf Cordier und seiner Ehefrau Käthe Cordier, geb. Rosellen, in Brühl geboren. Ich besuchte vier Jahre lang die Volksschule und anschließend fünf Jahre das Gymnasium in Brühl. Dann absolvierte ich eine kaufmännische Lehre, die ich nach drei Jahren mit der Kaufmannsgehilfenprüfung beendete. Es folgte ein zweijähriger Besuch der Höheren Wirtschaftsschule in Köln mit dem abschließenden Examen als Betriebswirt. Die Hochschulreife erlangte ich durch einen anschließenden zweijährigen Besuch des Instituts zur Erlangung der Hochschulreife in Oberhausen im Rahmen des sog. Zweiten Bildungsweges. Danach studierte ich sechs Semester Jura in Köln und anschließend zwölf Semester Medizin in Bonn. Das medizinische Staatsexamen bestand ich im Februar 1968. Seit Ostern 1966 bin ich verheiratet.

